

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12N 15/41, 15/52, C12Q 1/68, 1/70	A1	(11) 国際公開番号 WO00/58477 (43) 国際公開日 2000年10月5日(05.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01849 (22) 国際出願日 2000年3月27日(27.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/83930 1999年3月26日(26.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ゲノムサイエンス研究所 (GENOME SCIENCE LABORATORIES CO., LTD.)(JP/JP) 〒960-1242 福島県福島市松川町美郷4丁目1-1 Fukushima, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小林五月(KOBAYASHI, Satsuki)(JP/JP) 〒285-0855 千葉県佐倉市井野1588-5 Chiba, (JP) (74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR DETECTING MUTATION IN HEPATITIS B VIRUS AND DETECTION KIT (54)発明の名称 B型肝炎ウイルス遺伝子の変異検出方法および検出キット (57) Abstract A method for detecting a mutation in a gene encoding the reverse transcriptase active center of hepatitis B virus, in particular, a mutation in the YMDD motif; a primer set to be used in this method; and a kit including this primer set and a probe set. This method comprising amplifying by the PCR method a part of the gene sequence encoding the reverse transcriptase active center of hepatitis B virus seemingly having a mutation by using a set of primers of SEQ ID NOS: 1 and 2; then hybridizing the amplification product with each of probes of a probe mixture or a probe set containing the sequence of SEQ ID NO: 3 or 23; incorporating a labeled substrate by the mini-sequence method; and then detecting the labeled substrate to thereby detect the occurrence of the mutation in the reverse transcriptase active center of hepatitis B virus.		

(57)要約

B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異、特にYMDDモチーフ中の変異を検出するための方法、この方法において用いられるプライマーセット、プローブセット、及びこのプライマーセットとプローブセット含むキットを提供する。

配列番号1及び2のプライマーセットを用いて、変異が予想されるB型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子配列の一部をPCR法により増幅し、そしてその増幅産物を配列番号3及び23のいずれかの配列を含むプローブ混合物からなる各プローブ又はプローブセットにハイブリダイゼーションさせた後、ミニシーケンス法により標識基質を取り込み、その標識基質を検出することからなる、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無を検出する方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

B型肝炎ウイルス遺伝子の変異検出方法および検出キット

技術分野

- 5 本発明は、医学、臨床検査分野において、ラミブジン等のB型肝炎治療薬耐性B型肝炎ウイルスの検出及び、投薬モニタリングに有用な、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の検出に関する。

背景技術

- 10 我国のB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: 以下HBVと略する) の持続感染者は、無症候性キャリアを含めると150万人に達すると言われている。現在、抗ウイルス療法としてはインターフェロンが用いられているが、十分な効果が得られていない例も存在し、有効な抗ウイルス薬が待望されている。

- ラミブジン (Lamivudine) は英国グラクソ・ウエルカム社で開発された抗ウイルス薬で、当初はHIV治療薬として開発が進められたが、HBVにも有効であることが明らかになり、B型慢性肝炎治療薬としての開発が進められている (谷川ら、肝胆膵 35: 529-547, 1997; 日本グラクソ株式会社、BIO Clinica 13: 415-418, 1998)。ラミブジンの作用機序はラミブジンが細胞内で三リン酸誘導体にリン酸化されHBVの逆転写酵素を阻害すると共にウイルスゲノムに取り込まれてその核酸伸長合成 (複製) 反応を阻害することにより、抗ウイルス活性を示すと考えられている。ラミブジンは、天然の核酸には存在しない光学異性体 (立体配置) であるため、哺乳類のDNA複製には悪影響を及ぼさないという特徴がある。
- 15 20

- しかし最近になって、ラミブジンの長期投与により、ラミブジン耐性のHBVが出現する例があることが問題となりつつあり、この耐性を獲得したHBVは、そのゲノム中の共通した遺伝子に変異が生じていることが報告されている (Karl P. Fischer ら、ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER 40: 1957-1960, 1996; Roger Ling ら、HEPATOLOGY 24: 714-717, 1996)。この変異が生ずる部位は、HBVのポリメラーゼの逆転写酵素の活性中心部位であり、逆転写酵素に特有なアミノ酸配列、すなわち、チロシン (Y)・メチオニン (M)・アスパラギン酸 (D)・アスパラギン
- 25

酸 (D) からなるアミノ酸配列を有することから、YMDD モチーフ (第 736~747 ヌクレオチド) と呼ばれている (L. A. Kohlstaedt ら、SCIENCE 256 : 1783-1790, 1992)。ラミブジンの長期投与においては、この YMDD モチーフの M (メチオニン) が V (バリン)、I (イソロイシン) に置換され、HBV はラミブジン耐性を獲得する
5 と言われている。遺伝子レベルでは、メチオニンのコドンである ATG の A が G に
変異することによりバリンへ、または ATG の G が T、C、もしくは A に置換される
ことによりイソロイシンに置換されることになる。

従って、ラミブジン投薬時のラミブジン耐性ウイルス、つまり YMDD モチーフを
コードする遺伝子に上記のような変異を持ったウイルスが出現することのモニタ
10 リングは、ラミブジンの効果判定及び投薬計画の一助となり、大変有用であると
考えられる。

現在行われている HBV の上記のような変異の検出及び変異型ウイルス自体の検
出は、アミノ酸レベルでの検出が大変困難であるため、核酸レベルで行われてい
る。その一例としては、患者から採取された血清中より HBV ウイルス遺伝子を抽
15 出、精製し、次に変異が存在すると考えられる遺伝子配列周辺を PCR 法により増
幅し、増幅産物を直接 (ダイレクトシーケンシング法) もしくはサブクローニング
後、ダイデオキシ法により配列決定検査を行う方法が挙げられる。

その他には、点変異に対応する塩基を 3' 末端に有する遺伝子増幅用プライマ
ーを用い、変異遺伝子のみを PCR 法により増幅することにより点変異を検出する
20 PCR-SSP 法が用いられている (茶山ら、HEPATOLOGY 27 : 1711-1716, 1998)。

上記のような HBV 遺伝子の配列決定による検査は、オートシーケンサー等の
出現により現在ではかなりの部分で自動化されてはいるものの、検体入手から検
出まで数日を要し、時間がかかる上、大変繁雑かつ熟練を要する作業が含まれて
いる。また、経済的負担も大きく多数検体の処理には向いていない。さらに、遺
25 伝子配列検査では、野生型と変異型のウイルスが共存する状態ではその存在比率
を反映した結果が出ない可能性がある等の欠点を有する。

また PCR-SSP 法は、点変異の種類毎にプライマーセットの設計、PCR 条件等の
設定が必要であり、検出系が複雑である等の欠点を有している。

そこで、本発明は、(i) 検体入手から検出までが 1 日で終了し、(ii) オート

- シークエンサー等特別かつ高価な装置、及び熟練を要する技術なしに実施可能であり、(iii) 感度及び特異性が高く、そして (iv) 野生型と変異型の存在比率が互いに 10 倍程度であれば両者ともに検出が可能である、B 型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異検出方法を提供することを目的とする。

発明の開示

- 本発明者等は、B 型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心 (YMDD モチーフ) をコードする遺伝子の変異を検出する方法において、
- 10 HBV ゲノム遺伝子の一定領域、即ち、YMDD モチーフをコードする遺伝子の周辺領域の増幅に際し、特定のプライマーセットを用いること、
- さらには、増幅産物のハイブリダイゼーションに 3' 末端近傍をラミブジン長期投与時に YMDD モチーフをコードする遺伝子上で生ずる可能性のある遺伝子変異に応じて変化させ、さらには非特異的反応が生じないような人為的な変異の導
- 15 入及びプローブ長の適正化などの工夫を施した特定のプローブを用いること、
- 次いで、DNA ポリメラーゼにより、プローブの 3' 末端側に標識基質の取り込みを行わせ、取り込み反応を分析することにより、
- 簡易で、短時間で操作でき、かつ遺伝子上の変異を正確に判定する方法を見出し、本発明を完成するに至った。
- 20 即ち、本発明の方法は、検体に含まれる対立遺伝子とプローブが相補性を有するかどうか、及びその相補性の程度により、次いで行う DNA ポリメラーゼによる標識基質の取り込み反応が影響されることを利用する。
- 以下に、本発明を更に詳しく、ラミブジン長期投与時に生ずるラミブジン耐性 HBV の検出及び HBV 遺伝子上の YMDD モチーフをコードする遺伝子の変異検出を例
- 25 にとって説明する。しかしながら、ラミブジン以外の薬剤投与により HBV の YMDD モチーフ上に同様な変異を起こす場合があれば、それについても検出できることは言うまでもない。
- 尚、配列表においては、配列の小文字表記が義務付けられており、また、i (イノシン) は n として記載して、別途に i として特定しなければならないが、配列

表を除く本明細書においては、便宜上、特に断らない限り、配列は大文字表記を原則とし、イノシンは I として記載する。

図面の簡単な説明

- 5 図 1 は、HBV-DNA 中の、YMDD モチーフの位置及び配列番号：1 及び配列番号：2 のプライマー配列の位置を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 10 本発明の目的のためには、まず、予め HBV の逆転転写素の活性中心である YMDD モチーフをコードする遺伝子領域を含むように検体中の DNA を増幅しておくことが望ましい。

分析される鋳型 HBV 遺伝子は、HBV 感染者からの血清、組織等より抽出、精製するのが好ましい。

- 15 本方法で使用する増幅産物は、50bp 以上 300bp 以下が好ましく、80bp 以上 130bp 以下が更に好ましい。

増幅した産物はアルカリ変性させて 1 本鎖としたのち、変異に応じた各プローブとハイブリダイゼーションさせる。

プライマー配列の選択

- 20 HBV は比較的変異しやすいウイルスであることから、プライマー設定位置は各クローン間で保存性が高い部位を使用することが望ましい。

また、PCR の増幅効率やプライマーと標的核酸のハイブリダイゼーション特異性は、プライマー設定位置やプライマーの配列にも依存することから、PCR 増幅効率が良く、且つ特異性の高い部分にプライマーを設定する必要がある。

以上のことを総て考慮した結果、本発明では、以下のプライマーセット：

- 25 センスプライマー：5'-AGTGGGCCTC AGNCCGTTTC-3' (配列番号：1)、及び
アンチセンスプライマー：5'-AGACTTGGCC CCCAATACCA-3' (配列番号：2)
を用いる（但し、N は A, T, C 又は G の何れかもしくはイノシンもしくはユニバーサル塩基である）。配列番号：1 及び 2 は、図 1 に示すとおり、YMDD モチーフの前後に位置する。HBV-DNA は 3215 ヌクレオチドからなるが、配列番号：1 は第

645～664 ヌクレオチドに、そして配列番号：2は第749～768 ヌクレオチドに相当する。

- 但し、該配列プライマーセットでPCR法により増幅される部位の内側もしくは近傍外側であり、設定した遺伝子プローブ配列と完全に重複しない部位であれば、
- 5 該増幅産物の内側もしくは近傍外側にプライマーセットを設定することができることは言うまでもない。

プローブのデザイン

- 一般に、プローブのデザインにおいてハイブリダイゼーション特異性に影響する因子として考慮しなければならないのは、標的との配列の相同性とヌクレオチ
- 10 ドの長さである。

単一の配列のみを標的とするのならば、標的配列と全く同一な配列を有するプローブを用いればよい。長さに関しては、ヌクレオチドの合成コストを考えれば10～40bp程度が一般的である。

- しかしながら、変異及び／又は縮重により生じ得る複数の対立遺伝子同志を識別する場合や、複数の対立遺伝子群をまとめて識別したい場合であって、しかも検体数が多い場合には、可能な限りプローブの数を減らすのが普通である。即ち、
- 15 複数の対立遺伝子群を識別する際、最も一般的には、各群に対するプローブを1種類のみ用いる。よって、各群において縮重が複数存在する場合には、各々のプローブに関してひとつまたは複数のミスマッチ塩基が存在せざるを得なくなる。
- 20 即ち、より少ない数のプローブを用いて一度に多くの遺伝子群を識別するためには、目的の群と目的としない群との間のハイブリダイゼーション強度に偏りを生じさせるようにプローブをデザインしなくてはならず、プローブ中のミスマッチ塩基の数及び導入位置の選択はより困難になる。

- ミスマッチ導入の選択において、例えば、2つの連続するミスマッチと2つの
- 25 連続しないミスマッチとでは、同じミスマッチ含有率でもプローブ全体のハイブリダイゼーション強度に対する影響は違ふし、また、ミスマッチの位置によってもプローブ全体のハイブリダイゼーション効率に対する影響があると考えられる。

特定の対立遺伝子群のみのミスマッチ塩基の数を加減するためには、ユニバーサルな塩基（ニュートラルな塩基）を用いることもできる。ユニバーサルな塩基

としてはイノシン（I）が最も一般的であるが、隣接塩基の種類やハイブリダイゼーション条件等により、イノシンの特定の塩基に対する水素結合強度は影響を受けるとの報告もある。また、場合によっては、I：G結合よりも、ミスマッチ結合であるT：G結合の方が安定であるとの報告もある。

- 5 また、標的配列とプローブの結合においては、ハイブリダイゼーション条件におけるストリンジェンシーが影響する。ストリンジェンシーが高くなれば、一般に、ミスマッチな塩基対合は生じにくくなる。しかしながら、プローブの長さを変更したり、ミスマッチの導入位置や数を調節することにより、ストリンジェンシーによる影響は加減することができる。即ち、何らかの理由により、プローブ
10 の長さを長くできない場合や、ミスマッチ導入部位に制限がある場合などは、ストリンジェンシーにより対立遺伝子群間のハイブリダイゼーション強度を調節することもできる。

- 生検中のウイルスの変異遺伝子の識別に用いるためのプローブのデザインにおいては、変異型遺伝子の縮重を全てカバーすることに加えて、複合感染あるいは
15 変異型の復帰による野生型と変異型の共存の可能性を考慮しなければならない。なお、復帰変異に関しては、完全に野生型の遺伝子型に戻る真正復帰と、新たな変異により表現型上復帰させる抑圧復帰があるので、後者の可能性がある場合には、新たな対立遺伝子の可能性を考慮しなければならない。

- また、一般に、プローブの長さは、20bp 以上 40bp が好ましく、25bp 以上 35bp
20 以下が更に好ましい。

本発明のプローブは、3' 末端から数塩基上流側にミスマッチ変異部位が位置するようにデザインすると好適な結果が得られることを見いだしたうえで、デザインしたものである。

- ラミブジン長期投与時に生ずるラミブジン耐性HBVのYMDDモチーフの変異は、
25 アミノ酸レベルでは2種類が存在する。即ち、YMDDモチーフのYVDD（変異型V）もしくはYIDD（変異型I）への変異が確認されている。対応するコドンの塩基配列は、理論上、野生型M（ATG）から変異型V（GTA、GTT、GTC及びGTG）及び変異型I（ATA、ATT及びATC）を含めて、8種類の対立遺伝子が存在することになる。以下の表1において、各変異アミノ酸配列の塩基配列を比較する。

表 1

野生型	YMDD	TAT ATG GAT GAT
YVDD型変異		TAT gTA GAT GAT
		TAT gTt GAT GAT
5		TAT gTc GAT GAT
		TAT gTG GAT GAT
YIDD型変異		TAT ATa GAT GAT
		TAT ATc GAT GAT
		TAT ATt GAT GAT

- 10 但し、現在まで、ヒト由来のHBVについてラミブジン投与により生ずる変異型は、変異型Vの場合、野生型M(ATG)からみて2ポイントの変異型となるGTA、GTT及びGTCなる変異型は報告されていない。また、変異型Iの場合はATTへの変異のみが報告されているが、自然界にはATAへの変異例がラミブジン投与と関係無く存在するとの報告がある(Stephan Gunther ら、VIROLOGY 235:104-108, 1997)。

15 野生型(YMDD)の検出用プローブ

野生型(YMDD型)を検出する為のプローブには、野生型YMDDモチーフの塩基配列である TAT ATG GAT GAT の下線部を末端に含む、

5'-TCCCCCACTG TCTGGCTTTC AGTTATATGG-3' (配列番号: 3)

- を有するプローブを使用することができる。これで十分に野生型(YMDD)を検出できるが、本プローブは、下線部のメチオニンのコドンATGにおいて、変異型の配列であるYVDD型: TAT gTG GAT GAT もしくはYIDD型: TAT ATa GAT GAT、TAT ATt GAT GAT 及び TAT ATc GAT GAT と1塩基しか違いがなく(小文字部分)、検体中にこれら変異型が混在すると、時に変異型の増幅産物も弱いながらハイブリダイゼーションしてしまう可能性も考えられる。

- 25 この点を考慮すると、

5'-TCCCCCACTG TCTGGCTTTC AGTTATAVGG-3' (配列番号: 4)

を有するプローブが好ましい(Vは、A又はG又はCである)。このプローブは下線で示した部位に人為的に新たな変異を導入し、各変異型の遺伝子配列から見て2~3塩基のミスマッチになるようにすることにより、野生型での反応特異性を

低下させることなく、変異型との非特異反応を抑えることができる。VはA、Gでもよいが、Cへの変異を導入した、

5'-TCCCCCACTG TCTGGCTTTC AGTTATACGG-3' (配列番号: 5)

を有するプローブを使用することがより好ましい。即ち、配列番号: 5のプローブ

- 5 プの末端7塩基 (T A T A c G G) は、(i) 野生型とのミスマッチが小文字の1塩基であり、そして (ii) 7種の変異型とのミスマッチが下線部中のいずれか2～3塩基である。

この工夫は、ラミブジン投与により、いったんほぼ完全にラミブジン耐性 (変異型) となった HBV が、ラミブジン投与停止後、野生型に復帰変異を起こすとい

- 10 う臨床重要な所見をフォローする上で重要である。

YVDD 変異の検出用プローブ

変異型 (YVDD 型) の検出には、その塩基配列として、TAT GTa GAT GAT、TAT GTt GAT GAT、TAT GTc GAT GAT 及び TAT GTg GAT GAT の4種類が考えられる為、これら4種類を同時に検出する場合は、これらの最初の7塩基を3'末端に含む以下

- 15 の4配列:

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTAG-3' (配列番号: 6)、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTTG-3' (配列番号: 7)、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTCG-3' (配列番号: 8)、及び

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTGG-3' (配列番号: 9)

- 20 を有する4種類のプローブの混合物、ないしは、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTIG-3' (配列番号: 10)

を有するプローブを使用することが好ましい。これで十分に変異型 (YVDD 型) を検出できるが、野生型が混在する場合、配列番号: 9又は配列番号: 10のプローブは野生型遺伝子と1塩基しか違いがなく (I: イノシンはどの塩基とも結合するユニバーサル塩基)、検体中に野生型が存在すれば、野生型の増幅産物も弱いながらハイブリダイゼーションしてしまう可能性がある。

- 25 この点を考慮すると、

この点を考慮すると、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTAG-3' (配列番号: 11)、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTTG-3' (配列番号: 12)、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTCG-3' (配列番号: 13) 及び

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTGG-3' (配列番号: 14)

の各々の配列を含むプローブの混合物、ないしは、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTIG-3' (配列番号: 15)

- 5 を有するプローブが好ましい。配列番号: 11~14 のプローブは、下線で示した部位に人為的に新たな変異を導入し (V は、A 又は G 又は C である)、野生型及び変異型 (YIDD 型) の遺伝子配列から見て 2 塩基のミスマッチになるようにすることにより、変異型 (YVDD 型) での反応特異性を低下させることなく、野生型もしくは変異型 YIDD との非特異反応を抑えることができる。あるいは、総ての YVDD 型
- 10 を検出できる配列番号: 15 のプローブを使用してもよい。V は A、G でもよいが、C への変異を導入した、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTAG-3' (配列番号: 16)、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTTG-3' (配列番号: 17)、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTCG-3' (配列番号: 18) 及び

- 15 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTGG-3' (配列番号: 19)

の各々の配列を含むプローブの混合物、ないしは、

5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTIG-3' (配列番号: 20)

を有するプローブを使用することがより好ましい。以下の表 2 に、配列番号: 5~10 及び 16~20 の末端 7 塩基の変異部位周辺の塩基配列を比較する。

20 表 2

		野生型とのミス マッチ(小文字)	YIDD 型とのミス マッチ(下線)	YVDD 型との ミスマッチ
	配列番号: 6 T A T <u>g</u> T a G	2	1	0
	配列番号: 7 T A T <u>g</u> T t G	2	1	0
25	配列番号: 8 T A T <u>g</u> T c G	2	1	0
	配列番号: 9 T A T <u>g</u> T <u>G</u> G	1	2	0
	配列番号: 10 T A T <u>g</u> T I G	1	1	0
	配列番号: 16 T A <u>c</u> <u>g</u> T a G	3	2	1
	配列番号: 17 T A <u>c</u> <u>g</u> T t G	3	2	1

配列番号：18	T A <u>c</u> <u>g</u> T c G	3	2	1
配列番号：19	T A <u>c</u> <u>g</u> T <u>G</u> G	2	3	1
配列番号：20	T A <u>c</u> <u>g</u> T I G	2	2	1

- (注：ミスマッチの数に関して、配列番号：11～15 はそれぞれ配列番号：16～20
5 と同じであるため、記載を省略する)

YIDD 変異の検出用プローブ

変異型 (YIDD 型) の検出には、その塩基配列として、TAT ATa GAT GAT、TAT ATc GAT GAT 及び TAT ATt GAT GAT の 3 種類が考えられる為、これら 3 種類を同時に検出する場合は、これらの最初の 7 塩基を 3' 末端に含む以下の 3 配列：

- 10 5'-CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATaG-3' (配列番号：21)、
5'-CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATcG-3' (配列番号：22) 及び
5'-CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATtG-3' (配列番号：23)

- を有する 3 種類のプローブの混合物を使用する。これらのプローブは、変異型 (YVDD 型) に関して現在までに報告されている配列が TAT GTG G.... のみであり、
15 下線部において配列番号：21～23 と 2 塩基の違いが生じるため、変異型 (YVDD 型) による非特異反応が生じず、実際の検出上問題とならない。また野生型 (YMDD 型) の塩基配列とは 1 塩基のみの違いであるが (小文字)、他のプローブ (30bp) と同温度でのハイブリダイゼーション反応において、プローブ長を 5 bp 短くすることにより、3' 末端部の変異導入部位の影響を大きくし、ハイブリダイゼーションの特異性を向上させ、非特異的反応を防ぐことができる。従って、変異型 (YIDD
20 型) における遺伝子変異検出には、配列番号：21、22 及び 23 を有するプローブを使用する。

- アミノ酸置換は生じないが、遺伝子置換が生ずるコドンの 3 番目の塩基についての変異をも確認したい場合は、YVDD 型変異の場合は、配列番号：6、7、8 及び
25 9 のプローブ、もしくは 16、17、18 及び 19 のプローブを使用し、また、YIDD 型変異の場合は配列番号：21、22 及び 23 のプローブを分けて使用することが好ましい。

プローブの組み合わせ

したがって、本発明の一つの態様において、B 型肝炎ウイルスの逆転写酵素活

性中心をコードする遺伝子の変異の有無の検出に用いるプローブセットは、

(i) 配列番号：3を有するプローブ、配列番号：4を有するプローブ及び配列番号：5を有するプローブのうち少なくとも1種からなるプローブセット；及び

(ii) (a) 配列番号：6を有するプローブ、配列番号：7を有するプローブ、
5 配列番号：8を有するプローブ及び配列番号：9を有するプローブを含むプローブ混合物、

(b) 配列番号：10を有するプローブ、

(c) 配列番号：11を有するプローブ、配列番号：12を有するプローブ、
配列番号：13を有するプローブ及び配列番号：14を有するプローブを含むプローブ混合物、及び
10

(d) 配列番号：15を有するプローブ
のうち少なくとも1種からなるプローブセット；及び／又は

(iii) 配列番号：21を有するプローブ、配列番号：22を有するプローブ及び
配列番号：23を有するプローブを含むプローブ混合物

15 からなる。

本発明のもう一つの態様において、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心を
コードする遺伝子の変異の有無の検出に用いるプローブセットは、

(i) 配列番号：5を有するプローブ；

(ii) (a) 配列番号：16を有するプローブ、配列番号：17を有するプローブ、
20 配列番号：18を有するプローブ及び配列番号：19を有するプローブを含むプローブ混合物、及び

(b) 配列番号：20を有するプローブ
のうち少なくとも1種からなるプローブセット；及び

(iii) 配列番号：21を有するプローブ、配列番号：22を有するプローブ及び
25 配列番号：23を有するプローブを含むプローブ混合物
からなる。

また、本発明のさらなる態様において、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中
心をコードする遺伝子の変異の有無の検出に用いるプローブセットは、

(i) 配列番号：5を有するプローブ；

(ii) 配列番号：20 を有するプローブ；及び

(iii) 配列番号：21 を有するプローブ、配列番号：22 を有するプローブ及び配列番号：23 を有するプローブを含むプローブ混合物からなる。

- 5 使用する遺伝子プローブは、予め変異の種類別に担体に固相化しておくことが望ましい。例えば、上記のプローブ3セット5種類（配列番号：5、配列番号：20 及び配列番号：21、22 及び 23 の混合物）を用いる態様であれば、固相化担体として操作が容易なマイクロプレートのウェルに3ウェル/1検体となるように固相化しておくことが好ましく、このプローブが固相化されたウェル内でハイブリダイゼーション反応を行う。
- 10 ハイブリダイゼーション反応

- ハイブリダイゼーション反応は、増幅時の副産物を選択的に除去する反応でもある。更にハイブリダイゼーションの際に選択性を追求するのであれば、ハイブリダイゼーションの際の温度を適正化することが必要である。本発明のハイブリダイゼーション時の温度は好ましくは 25℃～65℃であり、より好ましくは 37℃～60℃である。
- 15 検体中の標的遺伝子とプローブをハイブリダイゼーションさせた後、標識基質と DNA ポリメラーゼを加えて取り込み反応（ミニシークエンス反応）を実施する。

- この時、温度、反応緩衝液組成などの反応条件の調整を行い、プローブがハイブリダイゼーションした時のみ標識基質の取り込みが起こるようにする。
- 20 取り込み反応

- DNA の取り込み反応（ミニシークエンス反応）において、分子運動を高めて特異性を上げる必要がある場合は、耐熱性の DNA ポリメラーゼを用いて高い反応温度で行うことが望ましい。Taq DNA ポリメラーゼ（パーキンエルマー社製）をミニシークエンス反応の DNA ポリメラーゼとして使用する場合、反応温度は好ましくは 37℃～80℃であり、より好ましくは 50℃～75℃である。
- 25 伸長合成反応を行う際に用いる反応緩衝液は、通常、使用する DNA ポリメラーゼの酵素活性が発揮されるように条件を整えた緩衝液を用いれば良い。しかし DNA ポリメラーゼの酵素活性が強すぎて非特異的取り込み反応が出る場合は、本

測定法においては最終濃度が 0.1~1.5M 程度になるよう尿素を加えることにより DNA ポリメラーゼの酵素活性を微妙に抑制的にコントロールすることが可能である。

- 5 Taq DNA ポリメラーゼを伸長合成反応時の DNA ポリメラーゼとして使用する場合は、酵素購入時に添付されてくる反応緩衝液に対して、最終濃度が 0.5M~0.75M になるよう尿素を添加して使用することができる。

- 本発明においては、ハイブリダイゼーションしたプローブ群の 3' 末端から伸長合成反応（取り込み反応）を行うので、変異しないアミノ酸に対応する塩基部分が全プローブの末端部分に来るように選択して、第 1 に取り込まれる塩基が共通になるようにすることが好ましい。本発明の好ましい態様において使用される配列番号：3~23 は、YMDD モチーフ中の変異するアミノ酸 M のすぐ次の、変異しないアミノ酸 D のコドン（GAT）の第 1 ヌクレオチドの G で終わっているので、全てのプローブの 3' 末端に最初に付加される塩基は、第 2 ヌクレオチドの A である。従って、標識基質は dATP を用い、標的遺伝子とプローブの 3' 末端部分が 2 本鎖を形成していれば、標識基質である塩基「A」が DNA ポリメラーゼにより取り込まれ、2 本鎖になっていなければ、取り込み反応は理論上起こらない。

標識の検出

- この標識体を特異的に検出する方法としては、標識体と特異的に結合できる酵素標識を施した物質を使用して発色法、発光法、蛍光法など使用して行う。但し、20 蛍光法の場合、蛍光物質の多くは比較的低分子量であるため塩基に直接標識させて、伸長合成反応において直接取り込ませることも可能である。

- 標識自体を酵素にする方法も考えられるが、蛋白質酵素は一般的に高分子であり、標識塩基の取り込みの際に立体障害を起こす可能性が高く、取り込み時の加熱に際して酵素が失活する可能性も高い為、標識体は、分子量が小さく、比較的安定且つ、特異的検出が可能な物質である、ビオチン、ジニトロフェニル（DNP）、ジゴキシゲニン（DIG）などを用いることが望ましい。

25 標識体の検出には、ビオチンであればアビジンもしくはストレプトアビジン、DNP、DIG に対しては各々を認識する抗体に酵素を標識したものを結合させて、その酵素活性を発色法、発光法、蛍光法などにより、吸光度計、ルミノメーター、

蛍光光度計にて検出する。

- 5 標識体の検出を行った結果、標識体が検出されたウェルでは、そのウェルに固相化されたプローブの3'末端付近の配列に対して、ほぼ相補的な配列を持つ遺伝子が存在していたと判定される。標識体が検出されなかったウェルでは、そのウェルに固相化されたプローブとほぼ相補的な配列を持った遺伝子が存在しないか、もしくは検出感度以下であると判定される。また複数の遺伝子型が混在している場合は、複数のウェルで標識体が検出されることになる。各型の遺伝子の増幅前の存在比率は、増幅後の増幅産物の存在比率に反映されるため、各ウェルの検出の強度により対立遺伝子の存在比率の概算も可能である。

10 キット

- 更に、本発明は、HBV ゲノム遺伝子における YMDD モチーフをコードする遺伝子上の点変異を検出する方法を使用したキットにも関し、キットの好適例としては、
(1) HBV ゲノム遺伝子の YMDD モチーフをコードする遺伝子の周辺領域の増幅産物を得るための配列番号：1のプライマー及び配列番号：2のプライマーからなる PCR 用プライマーセット、
15 (2) HBV の YMDD モチーフをコードする遺伝子上の点変異部位に対応する塩基を3'末端近傍に有する遺伝子プローブ、好ましくは配列番号：5、配列番号：20、及び配列番号：21～23の混合プローブ、もしくはその各プローブの固相化物、
(3)二本鎖の増幅産物を一本鎖にするためのアルカリ変性液、
(4)ハイブリダイゼーション反応時に用いるハイブリダイゼーション緩衝液、
20 (5) DNA ポリメラーゼ、(6) 標識基質を含有するミニシーケンス用緩衝液が挙げられる。

- 本発明の方法の目的とする遺伝子に対する特異性を評価するため、本発明で PCR 増幅を行う領域を含み且つ、野生型、変異型に対応する配列を含む8種類の特異性評価用プラスミドを作製し、これを鋳型に PCR 増幅を行い、変性後、プレートに固相化したプローブにハイブリダイゼーションさせ、標識基質の取り込みを検出した。
25 その結果、野生型の配列を持つ評価用プラスミドは野生型用のプローブを固相化したウェルについて、バリン型、イソロイシン型の変異型の配列を持つ評価用プラスミドは各々の変異型のプローブを固相化したウェルについてのみ標識体の取り込みが検出され、互いに違う型のプローブが固相されたウェルに

については検出されなかった。

更に、各変異型用プラスミドを野生型用プラスミドに対して「1/10 または 10 倍」混合させて同様に検出を行った場合、「1/10 または 10 倍」までについては両型の検出が可能であった。

- 5 これらの結果から、本発明方法により非常に特異性高く、目的とする点変異を検出できることがわかる。

実施例

- 10 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

〈鋳型遺伝子の準備〉

- 15 「野生型 HBV のみを含む」と従来法により確認された血清 10 例（検体番号 1～10）及び、「逆転写酵素活性中心コード遺伝子に変異を有する変異型 HBV を含む」と従来法により確認された血清 9 例（検体番号 11～19）の計 19 検体より、HBV 遺伝子を抽出及び精製した。

なお、本明細書における従来法とは、血清中より HBV 遺伝子を抽出、精製し、逆転写酵素活性中心コード遺伝子配列周辺を PCR 法により増幅後、その増幅産物についてダイデオキシ法により塩基配列を決定する方法である。この方法では、変異有無の検出までに 2～3 日要する。

- 20 〈PCR 法による遺伝子増幅〉

プライマーは、以下の 2 種類：

センスプライマー：5'-AGTGGGCCTC AGNCCGTTTC-3'（配列番号：1）及び

アンチセンスプライマー：5'-AGACTTGGCC CCCAATACCA-3'（配列番号：2）

を用いた。但し、配列番号：1 の N は I（イノシン）にて使用することとした。

- 25 上記プライマーを使用して下記組成の遺伝子増幅液 50 μ l を調製し、PCR 法により遺伝子増幅を行った。

1 0 mM トリス塩酸緩衝液（pH8.3）

5 0 mM 塩化カリウム

1. 2 5 mM 塩化マグネシウム

- 1 2.5 % グリセロール
 2 0 0 μ M dNTP (dATP, dTTP, dCTP 及び dGTP)
 0.6 μ M センスプライマー
 0.6 μ M アンチセンスプライマー
 5 25 U/ml Taq DNA ポリメラーゼ (パーキンエルマー社製)

鋳型遺伝子

- 上記溶液をサーマルサイクラーPJ-9600 (パーキンエルマー社製) にセットした。
 PCR の温度条件は 95℃ で 2 分間の後、95℃ で 15 秒→60℃ で 20 秒のサイクルを
 5 回、続いて 90℃ で 15 秒→60℃ で 20 秒のサイクルを 65 回繰り返して遺伝子増
 10 幅を行った。その結果、HBV が陽性の場合、124bp の増幅産物が得られた。

〈増幅産物の変性〉

得られた増幅産物 50 μ l に対して 0.3M の水酸化ナトリウム溶液 100 μ l を加え、
 5 分間室温で放置し、増幅産物のアルカリ変性 (2 本鎖 DNA を 1 本鎖にする) を
 行った。

- 15 〈ハイブリダイゼーション〉

次に、予め、

第 1 ウェルには、

5'-TCCCCCACTG TCTGGCTTTC AGTTATACGG-3' (配列番号 : 5) のプローブを、

第 2 ウェルには、

- 20 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTIG-3' (配列番号 : 20) のプローブを、そ
 して

第 3 ウェルには、

5'-CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATAG-3' (配列番号 : 21)、

5'-CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATCG-3' (配列番号 : 22) 及び

- 25 5'-CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATTG-3' (配列番号 : 23) の 3 種類のプローブの混
 合物

をそれぞれ固相化した。即ち、野生型 (YMDD 型) 検出用ウェル、変異型 (YVDD
 型) 検出用ウェル、及び変異型 (YIDD 型) 検出用ウェルの 3 ウェルで 1 セット (1
 検体) のプローブ固相化ウェルを用意した。各ウェルに、以下に示す組成のハイ

ブリダイゼーション緩衝液を 100 μ l ずつ分注した。

7.5 \times SSPE

1.2 % ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween20)

0.07 N 塩酸

- 5 次に、アルカリ変性を行った増幅産物を 25 μ l ずつ、上記ハイブリダイゼーション緩衝液を分注した各ウェルに添加し、よく混合した。

- 混合物を 55℃で 30 分間放置し、ハイブリダイゼーションを行った。この反応により PCR 法の段階において仮に非特異の増幅産物として増幅された遺伝子断片が存在したとしても、目的とする増幅産物以外は選択的に除かれる。但し、目的とする各型の増幅産物は型別各プローブに対して末端が 1 から 2 塩基程度の違いであるため、程度の差はあれ、総てのプローブに対してハイブリダイゼーションしていると考えられる。

ハイブリダイゼーション反応終了後、下記組成の洗浄溶液を使用して 1 ウェルあたり 350 μ l ずつ 5 回洗浄を行った。

- 15 0.4 % 塩化ナトリウム
0.01 % 塩化カリウム
0.145 % リン酸一水素二ナトリウム
0.01 % リン酸二水素一カリウム
0.1 % Tween20
20 0.005 % アジ化ナトリウム

〈ミニシーケンス反応〉

洗浄操作終了後、下記組成のように塩基 A の標識体であるビオチンを結合させたビオチン-dATP と Taq DNA ポリメラーゼを添加した溶液 100 μ l を各ウェルに加え、55℃で 30 分間、反応させた。

- 25 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.3)
50 mM 塩化カリウム
1.5 mM 塩化マグネシウム
0.001 % ゼラチン
0.6 M 尿素

0.04 μ M ビオチン-dATP
1 U/ml Taq DNA ポリメラーゼ

〈変性〉

- 5 反応終了後、0.3Mの水酸化ナトリウム溶液100 μ lを加え、5分間室温で放置し、前述の洗浄溶液と洗浄条件で洗浄を行った。この処理により、固相化プローブにハイブリダイゼーションした増幅産物は、プローブより除去され、固相面には1本鎖のプローブのみが残り、増幅産物の副反応などにより非特異的に取り込まれたビオチン標識基質が除去される。

〈アビジン-ビオチン複合体の形成〉

- 10 次に、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを20mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に0.2U/mlの濃度になるように加え、各ウェルに100 μ lずつ加えて55℃で30分間反応させた。ビオチンとストレプトアビジンの特異反応を利用したこの反応により、前述の反応でビオチン標識基質が取り込まれた固相化プローブにペルオキシダーゼが標識される。反応終了後、前述の洗浄溶液と洗浄条件で洗浄を行った。

〈発色反応〉

- 20 洗浄後、ペルオキシダーゼの発色基質である H_2O_2 （過酸化水素）と3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを各ウェルに100 μ lずつ加え、室温で15分間発色させた。この工程で、ペルオキシダーゼ標識された固相化プローブが存在するウェル、つまり固相化プローブと目的とするPCR増幅産物がハイブリダイゼーションし、且つ、前述の反応でビオチン標識基質が取り込み反応が起こったウェルは、青色に発色する。反応終了後、反応停止液を100 μ lずつ加えて発色反応を停止した。この操作により、青色に発色したウェルは黄色に変色する。最後に各ウェルを吸光度計にて波長450nmにおける吸光度を測定し検出を行った。

25 〈結果〉

1. 検体番号1~10

「野生型のみを含む」と従来法で確認されている検体番号1~10については、本実施例での変異検出の結果においても、全ての検体でメチオニン型(ATG)を検出する第1ウェルにのみ発色が観察され、野生型のみを含むと判定された。

測定された吸光度は以下に示す通りである。なお、吸光度値のカットオフ値は第1ウェルは0.1、第2ウェルは0.3、第3ウェルは0.3とした。括弧内に示す「+」は陽性を、そして「-」は陰性を示す。

表3

5	検体	吸光度 (判定)			型判定
	番号	第1ウェル	第2ウェル	第3ウェル	
	1	3.694(+)	0.113(-)	0.074(-)	野生型
	2	3.257(+)	0.119(-)	0.145(-)	野生型
	3	3.073(+)	0.116(-)	0.075(-)	野生型
10	4	3.098(+)	0.167(-)	0.145(-)	野生型
	5	2.358(+)	0.136(-)	0.059(-)	野生型
	6	3.141(+)	0.110(-)	0.068(-)	野生型
	7	2.750(+)	0.099(-)	0.146(-)	野生型
	8	3.208(+)	0.117(-)	0.060(-)	野生型
15	9	3.312(+)	0.155(-)	0.121(-)	野生型
	10	3.479(+)	0.137(-)	0.066(-)	野生型

2. 検体番号11~19

「変異型 HBV を含む」と従来法で確認されている検体番号11~19については、本実施例での変異検出の結果においても、下表の通り全ての検体で従来法で得られた結果と同一の型判定結果が得られた。即ち、検体がバリン型の変異型遺伝子を有する場合は第2ウェルに発色が観察され、検体がイソロイシン型の変異型遺伝子を有する場合は、第3ウェルに発色が観察された。検体が野生型遺伝子も含む場合は、第1ウェルにも発色が認められた。

測定された吸光度は下表に示すとおりである。

25 25 なお、吸光度値のカットオフ値は第1ウェルは0.1、第2ウェルは0.3、第3ウェルは0.3とした。括弧内に示す「+」は陽性を、そして「-」は陰性を示す。

表4

検体	吸光度 (判定)			本発明による	従来法による
番号	第1ウェル	第2ウェル	第3ウェル	判定	判定

	1 1	2.082(+)	0.460(+)	0.182(-)	野生型+変異型(V)	同左
	1 2	1.521(+)	2.880(+)	1.166(+)	野生型+変異型(V+I)	同左
	1 3	0.059(-)	3.570(+)	1.122(+)	変異型(V+I)	同左
	1 4	3.149(+)	0.301(+)	0.097(-)	野生型+変異型(V)	同左
5	1 5	3.318(+)	0.750(+)	0.174(-)	野生型+変異型(V)	同左
	1 6	3.144(+)	1.457(+)	0.188(-)	野生型+変異型(V)	同左
	1 7	2.453(+)	1.488(+)	0.177(-)	野生型+変異型(V)	同左
	1 8	0.089(-)	3.439(+)	2.230(+)	変異型(V+I)	同左
	1 9	1.139(+)	3.749(+)	0.643(+)	野生型+変異型(V+I)	同左

10

産業上の利用の可能性

本発明によれば、特定のプライマー及び、遺伝子プローブを用いることにより、また特定のプライマー及び、固相支持体に固相化した特定の遺伝子プローブ、成分調製を行い適正化したアルカリ変性液、ハイブリダイゼーション用緩衝液、DNA

15 ポリメラーゼ、標識基質を含有するミニシーケンス用緩衝液を含有したキットを用いることにより、HBV 遺伝子上の YMDD モチーフをコードしている遺伝子の点変異を簡便且つ、正確に、また短時間で判定することができる。このことは、投薬時、特にラミブジン長期継続投与時の投薬効果の判定（モニタリング）、投与計画を立てる上で有用である。

請 求 の 範 囲

1. 5'-AGTGGGCCTC AGNCCGTTTC-3' (配列番号: 1) 又は
5'-AGACTTGGCC CCCAATACCA-3' (配列番号: 2)
- 5 に記載の塩基配列を有する (但し、N は A, T, C 又は G の何れかもしくはイノシンもしくはユニバーサル塩基である)、B型肝炎ウイルス DNA に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー。
2. 5'-AGTGGGCCTC AGNCCGTTTC-3' (配列番号: 1) 及び
5'-AGACTTGGCC CCCAATACCA-3' (配列番号: 2)
- 10 に記載の塩基配列を有する (但し、N は A, T, C 又は G の何れかもしくはイノシンもしくはユニバーサル塩基である)、B型肝炎ウイルス DNA に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを備えた、PCR 法による B型肝炎ウイルス DNA の増幅に用いるプライマーセット。
3. B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無の
- 15 検出に用いる、配列番号 3 乃至 23 :
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATATGG-3' (配列番号: 3)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATAVGG-3' (配列番号: 4)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATACGG-3' (配列番号: 5)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTAG-3' (配列番号: 6)、
 - 20 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTTG-3' (配列番号: 7)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTCG-3' (配列番号: 8)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTGG-3' (配列番号: 9)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTATGTIG-3' (配列番号: 10)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTAG-3' (配列番号: 11)、
 - 25 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTTG-3' (配列番号: 12)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTCG-3' (配列番号: 13)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTGG-3' (配列番号: 14)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTAVGTIG-3' (配列番号: 15)、
 - 5'-TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTAG-3' (配列番号: 16)、

- 5' -TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTTG-3' (配列番号 : 17)、
 5' -TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTCG-3' (配列番号 : 18)、
 5' -TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTGG-3' (配列番号 : 19)、
 5' -TCCCCCACTG TTTGGCTTTC AGTTACGTIG-3' (配列番号 : 20)、
 5 5' -CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATAG-3' (配列番号 : 21)、
 5' -CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATCG-3' (配列番号 : 22) 及び
 5' -CACTGTTTGG CTTTCAGTTA TATTG-3' (配列番号 : 23)

のいずれかの塩基配列を有する (但し、I はイノシンであり、そしてVはA又はG又はCである)、オリゴヌクレオチドプローブ。

- 10 4. B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無の検出に用いる、

(i) 配列番号 : 3 を有するプローブ、配列番号 : 4 を有するプローブ及び配列番号 : 5 を有するプローブのうち少なくとも1種からなるプローブセット ; 及び

- 15 (ii) (a) 配列番号 : 6 を有するプローブ、配列番号 : 7 を有するプローブ、配列番号 : 8 を有するプローブ及び配列番号 : 9 を有するプローブを含むプローブ混合物、

(b) 配列番号 : 10 を有するプローブ、

- (c) 配列番号 : 11 を有するプローブ、配列番号 : 12 を有するプローブ、配列番号 : 13 を有するプローブ及び配列番号 : 14 を有するプローブを含むプローブ混合物、及び

- 20 (d) 配列番号 : 15 を有するプローブ

のうち少なくとも1種からなるプローブセット ; 及び/又は

- (iii) 配列番号 : 21 を有するプローブ、配列番号 : 22 を有するプローブ及び配列番号 : 23 を有するプローブを含むプローブ混合物
 25 からなるプローブセット。

5. B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無の検出に用いる、

(i) 配列番号 : 5 を有するプローブ ;

(ii) (a) 配列番号 : 16 を有するプローブ、配列番号 : 17 を有するプローブ、

配列番号：18 を有するプローブ及び配列番号：19 を有するプローブを含むプローブ混合物、及び

(b) 配列番号：20 を有するプローブ

のうち少なくとも1種からなるプローブセット；及び

- 5 (iii) 配列番号：21 を有するプローブ、配列番号：22 を有するプローブ及び配列番号：23 を有するプローブを含むプローブ混合物からなるプローブセット。

6. 以下の工程：

- 請求項2記載のプライマーセットを用いて、変異が予想されるB型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子配列の一部をPCR法により増幅し、
10 そして

その増幅産物を請求項4記載の(i)及び(ii)及び/又は(iii)の各プローブセットにハイブリダイゼーションさせた後、ミニシーケンス法により標識基質を取り込み、その標識基質を検出すること

- 15 を有する、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無を検出する方法。

7. 以下の工程：

- 請求項2記載のプライマーセットを用いて、変異が予想されるB型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子配列の一部をPCR法により増幅し、
20 そして

その増幅産物を請求項5記載の(i)、(ii)及び(iii)の各プローブセットにハイブリダイゼーションさせた後、ミニシーケンス法により標識基質を取り込み、その標識基質を検出すること

- 25 を有する、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無を検出する方法。

8. (a) 請求項2記載のプライマーセットを含むPCR反应用試薬、

(b) 請求項4記載の各プローブセットが固相化された固相支持体、

(c) DNAポリメラーゼ、及び

(d) 標識基質を含有するミニシーケンス用緩衝液

を含む、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無を検出するためのキット。

9. (a)請求項2記載のプライマーセットを含むPCR反応用試薬、
(b)請求項5記載の各プローブセットが固相化された固相支持体、
5 (c)DNAポリメラーゼ、及び
(d)標識基質を含有するミニシーケンス用緩衝液
- を含む、B型肝炎ウイルスの逆転写酵素活性中心をコードする遺伝子の変異の有無を検出するためのキット。

配 列 表

- <1 1 0> ゲノムサイエンス研究所
 <1 2 0> B型肝炎ウイルス遺伝子の変異検出方法および検出キット
 5 <1 3 0> YCT-489
 <1 6 0> 23
- <2 1 0> 1
 <2 1 1> 20
 10 <2 1 2> DNA
 <2 1 3> Artificial Sequence
- <2 2 0>
 <2 2 1> gene
 15 <2 2 2> 13
 <2 2 3> Designed primer wherein, at position 13, n may be a, g,
 c, t, or any universal base such as i.
- <4 0 0> 1
 20 agtgggcctc agnccgtttc 20
- <2 1 0> 2
 <2 1 1> 20
 <2 1 2> DNA
 25 <2 1 3> Hepatitis B Virus
- <2 2 0>
 <2 2 3> Designed primer

<4 0 0> 2

agacttggcc cccaatacca

20

<2 1 0> 3

5 <2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Hepatitis B Virus

<2 2 0>

10 <2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 3

tccccacig ttggctttc agttataig

30

15 <2 1 0> 4

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Hepatitis B Virus

20 <2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 4

tccccacig ttggctttc agttatavgg

30

25

<2 1 0> 5

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Designed probe

5 < 4 0 0 > 5

tccccccactg tttaggctttc agttatcagg

30

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 3 0

10 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Hepatitis B Virus

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Designed probe

15

< 4 0 0 > 6

tccccccactg tttaggctttc agttatgtag

30

< 2 1 0 > 7

20 < 2 1 1 > 3 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Hepatitis B Virus

< 2 2 0 >

25 < 2 2 3 > Designed probe

< 4 0 0 > 7

tccccccactg tttaggctttc agttatgttg

30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Hepatitis B Virus

5
<220>
<223> Designed probe

<400> 8
10 tccccactg ttggctttc agttatgtcg 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
15 <213> Hepatitis B Virus

<220>
<223> Designed probe

20 <400> 9
tccccactg ttggctttc agttatgtgg 30

<210> 10
<211> 30
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> gene

<2 2 2> 2 9

<2 2 3> Designed probe wherein n at position 29 is i.

<4 0 0> 1 0

5 tcccccactg ttggctttc agttatgtng

30

<2 1 0> 1 1

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

10 <2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

15 <4 0 0> 1 1

tcccccactg ttggctttc agttavgtag

30

<2 1 0> 1 2

<2 1 1> 3 0

20 <2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

25

<4 0 0> 1 2

tcccccactg ttggctttc agttavgttg

30

<2 1 0> 1 3

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

5 <2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 1 3

tcctccactg ttctggctttc agttavgtcg

30

10

<2 1 0> 1 4

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

15

<2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 1 4

20 tcctccactg ttctggctttc agttavgtgg

30

<2 1 0> 1 5

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

25 <2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<2 2 1> gene

<2 2 2> 2 9

<2 2 3> Designed probe wherein n at position 29 is i.

<4 0 0> 1 5

tcccccactg ttggccttc agttavgtg

30

5

<2 1 0> 1 6

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

10

<2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 1 6

15 tcccccactg ttggccttc agttacgtg

30

<2 1 0> 1 7

<2 1 1> 3 0

<2 1 2> DNA

20 <2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<2 2 3> Designed probe

25 <4 0 0> 1 7

tcccccactg ttggccttc agttacgtg

30

<2 1 0> 1 8

<2 1 1> 3 0

- <2 1 2> DNA
<2 1 3> Artificial Sequence
- <2 2 0>
5 <2 2 3> Designed probe
- <4 0 0> 1 8
tcccccaactg ttgggtttc agttacgtcg 30
- 10 <2 1 0> 1 9
<2 1 1> 3 0
<2 1 2> DNA
<2 1 3> Artificial Sequence
- 15 <2 2 0>
<2 2 3> Designed probe
- <4 0 0> 1 9
tcccccaactg ttgggtttc agttacgtgg 30
- 20 <2 1 0> 2 0
<2 1 1> 3 0
<2 1 2> DNA
<2 1 3> Artificial Sequence
- 25 <2 2 0>
<2 2 1> gene
<2 2 2> 2 9
<2 2 3> Designed probe wherein n at position 29 is i.

<4 0 0> 2 0
tccccactg ttggcttc agttacgng 30

5 <2 1 0> 2 1
<2 1 1> 2 5
<2 1 2> DNA
<2 1 3> Hepatitis B Virus

10 <2 2 0>
<2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 2 1
cactgtttgg ctttcagtta tatag 25

15 <2 1 0> 2 2
<2 1 1> 2 5
<2 1 2> DNA
<2 1 3> Hepatitis B Virus

20 <2 2 0>
<2 2 3> Designed probe

<4 0 0> 2 2
25 cactgtttgg ctttcagtta tatcg 25

<2 1 0> 2 3
<2 1 1> 2 5
<2 1 2> DNA

< 2 1 3 > Hepatitis B Virus

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Designed probe

5

< 4 0 0 > 2 3

cactgtttgg ctttcagtta tattg

25